

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium dengan *post test control group design* dengan tema Farmakologi dan Imunologi.

B. POPULASI DAN SAMPEL

Subjek penelitian ini berupa 25 ekor tikus wistar jantan dengan berat badan \pm 150 gram, dan berumur 10 minggu. Dalam penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 kelompok. Pengambilan sampel dilakukan secara *incidental sampling*.

Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus *Federer*, yaitu :

$$(k-1) (n-1) \geq 15$$

Keterangan :

k : jumlah kelompok

n : jumlah sampel dalam tiap kelompok (Purawisastra, 2001)

Dalam penelitian ini subjek dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga berdasarkan rumus *Federer* didapatkan jumlah subjek masing-masing kelompok sebagai berikut:

$$(k-1) (n-1) \geq 15$$

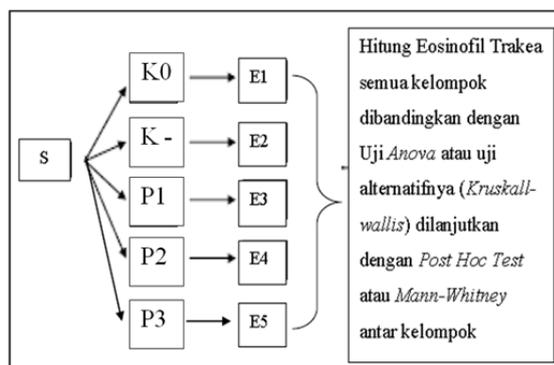
$$(5-1) (n-1) \geq 15$$

$$4 (n-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$n \geq 4,75 \rightarrow n \geq 5$$

Dalam penelitian ini tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus.



Gambar 8. Skema rancangan penelitian

Keterangan :

S = jumlah sampel

K0 = Kelompok (tanpa perlakuan) kontrol nol

K(-) = Kelompok (asma alergi/OVA) kontrol negatif

P1 = Kelompok OVA + ekstrak maja 125 mg/KgBB/hari

P2 = Kelompok OVA + ekstrak maja 250 mg/KgBB/hari

P3 = Kelompok OVA + ekstrak maja 500 mg/KgBB/hari

E1 = Jumlah granula eosinofil kelompok K0

E2 = Jumlah granula eosinofil kelompok K(-)

E3 = Jumlah granula eosinofil kelompok P1

E4 = Jumlah granula eosinofil kelompok P2

E5 = Jumlah granula eosinofil kelompok P3

C. WAKTU DAN TEMPAT

- a. Laboratorium Hewan Uji Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY
- b. Laboratorium Fitomedisin Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY
- c. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas

Dosis ekstrak *Aegle marmelos* yang diberikan

2. Variabel Terkendali

- a. Dapat dikendalikan : galur, berat badan, makanan, umur, dan jenis kelamin.
- b. Tidak dapat dikendalikan : Variasi kepekaan tikus terhadap suatu zat.

3. Variabel Tergantung

Jumlah total eosinofil trakhea

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Ekstrak korteks *Aegle marmelos*

Tumbuhan maja (*Aegle marmelos* Correa) didapatkan di daerah Wates, Kulonprogo, Yogyakarta. Korteks *Aegle marmelos* diekstraksi menggunakan cairan penyari etanol 96%. Ekstraksi korteks *Aegle marmelos* menggunakan metode maserasi.

2. Analisis Kualitatif Kromatografi Lapis Tipis

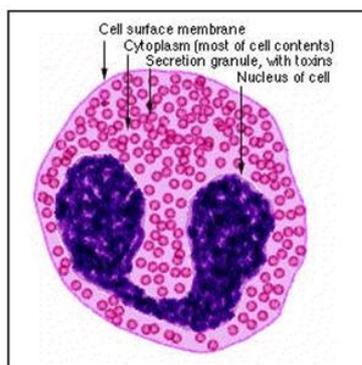
Untuk profil kromatogram, ekstrak kental *Aegle marmelos* akan difraksinasi dengan heksana dan kloroform melalui lempeng KLT silika gel GF 254. Cairan pengembang yang digunakan yaitu eluen heksana dan etil asetat, dan eluen toluene, eter, dietil eter (55:33:10). Pengamatan dilakukan dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm.

3. Analisis Kualitatif Densitometri

Untuk evaluasi hasil kromatografi lapis tipis, dilakukan pemindaian melalui pengukuran panjang gelombang pada analit yang merupakan bercak atau noda pada lempeng kromatografi lapis tipis melalui analisis densitometri. Pengukuran densitometri dapat dibuat dengan absorbansi. Panjang gelombang serapan maksimum dan minimum pada spectrum serapan diperoleh dan direkam (dalam nm) (Harborne, 1987).

4. Hitung Eosinofil Trakhea

Setelah tikus dikorbankan, diambil jaringan trakhea utama, kemudian direndam dalam larutan formalin buffer 10%, setelah itu dibuat blok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut untuk dibuat slide. Setelah itu dilakukan pewarnaan dengan *Hematoksin Eosin* (HE) untuk melihat dan menghitung jumlah eosinofil trakhea, untuk selanjutnya diidentifikasi dengan mikroskop cahaya. Pada mikroskop eosinofil dengan pengecatan *Hematoksin Eosin* (HE) terlihat berwarna keunguan dengan sitoplasma granuler, inti biasanya berlobus dua / bersegmen ganda dihubungkan benang sitoplasma yang tipis (Gambar 9). Jumlah total eosinofil trakhea dinyatakan dalam jumlah sel pada setiap lapangan pandang besar (400x) (Hermawan, 2009).



Gambar 9. Eosinofil (Hermawan, 2009)

F. ALAT DAN BAHAN

1. Alat

Alat yang digunakan untuk dalam penelitian ini yaitu kandang tikus, spuit 0,75 cc dan 3 cc dan sonde lambung, tabung ukur 10 ml dan 50 ml, gelas beker 100 ml, mikroskop cahaya (Olympus[®]), timbangan elektrik (Mettler Toledo[®]), gelas objek, mortir, pengaduk magnet termostat tipe 1419 (B. Brawn[®], W. Germany), vortex (CAT. M. Zippear Gmbh. Etzenbach[®], W. Germany), pipet volume mikro 100,0 μ L, 1000 μ L dan 5000,0 μ L (Gilson[®], model 15415, France), sinar UV 254 dan 366, plat KLT silika gel, cawan porselen, tabung reaksi, evaporator, penangas air dan densitometer (Camag[®]).

2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan yang diantaranya adalah tikus jantan \pm 150 mg, ekstrak korteks *Aegle marmelos*, ovalbumin (Sigma Aldrich[®]), akuades (Bratachem), pakan tikus (AD2[®]), formalin buffer 10%, *phosphate buffered saline*, blok parafin, pewarna *Hematoksin Eosin* (HE), pereaksi Vanillin sulfat, heksana (merck[®], p.a grade), pereaksi Dragendorf, HCl, H₂SO₄ pekat, NH₄OH dan CHCl₃ (merck[®], p.a grade).

G. PROSEDUR KERJA

1. Pembuatan Ekstrak Etanol *Aegle marmelos*.

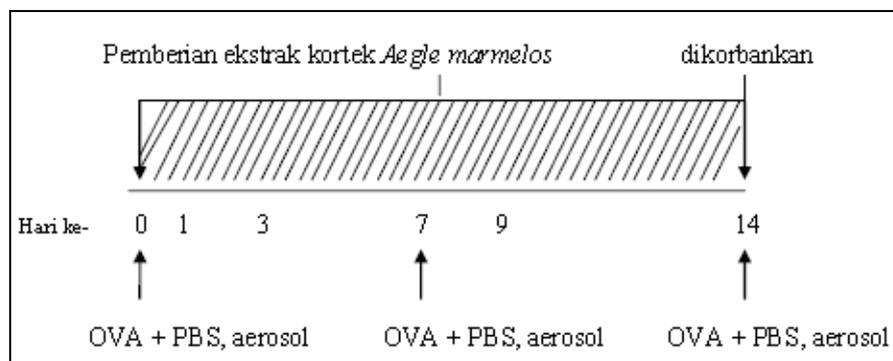
Korteks *Aegle marmelos* dikeringkan, dihaluskan dan kemudian diekstraksi dengan cairan penyari etanol 96%. Ekstraksi menggunakan metode maserasi. Tahap maserasi dilakukan selama 5 x 24 jam, setiap 24 jam dilakukan pengadukan. Pada hari ke 5 dilakukan penyaringan dan dimaserasi kembali selama 3 x 24 jam menggunakan etanol 96% yang baru. Setelah dimaserasi, ekstrak cair dievaporasi 80 rpm pada suhu 55°C. Untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dilakukan penguapan diatas penangas air.

2. Penyiapan Seri Konsentrasi Ovalbumin

Larutan inhalasi ovalbumin mengandung 0,1 g serbuk ovalbumin dalam 10 ml larutan phosphate buffered saline (PBS). Larutan PBS dibuat dengan menimbang KCl 0,1 g, KH₂PO₄ 0,1 g, NaCl 4 g, dan Na₂HPO₄.H₂O 1,08 g yang dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Larutan yang digunakan untuk sensitisasi 1 kelompok perlakuan dibuat dengan mengambil 10 ml larutan ovalbumin dalam PBS pada pH 7,4.

3. Induksi Asma Tikus dengan Alergen OVA

Untuk membuat tikus model asma alergi dilakukan sensitisasi awal pada tikus dengan inhalasi 1% ovalbumin dalam PBS tiap 1 kelompok perlakuan. Sensitisasi ulangan dilakukan secara inhalasi 7 dan 14 hari berikutnya (Subijanto dan Diding, 2008).



Gambar 10. Sensitisasi tikus model asma

4. Pembuatan dan Perlakuan Dosis Ekstrak Korteks Maja

Kelompok perlakuan 1 = 125 mg/1000 gBB* = 18,75 mg/150 g

Kelompok perlakuan 2 = 250 mg/1000 gBB = 37,50 mg/150 g

Kelompok perlakuan 3 = 500 mg/1000 gBB = 75 mg/150 g

*nb : ekstrak maja (mg)/berat badan tikus (gram)

Dengan asumsi kapasitas volume maksimal lambung tikus yaitu 5 ml, maka;

Kelompok perlakuan 1 = 18,75 mg/0,75 ml

Kelompok perlakuan 2 = 37,5 mg/1,5 ml

Kelompok perlakuan 3 = 75 mg/3 ml

a. Pemberian ekstrak maja selama 14 hari

Kelompok P 1 = 0,75 ml x 5* = 3,75 ml

Kelompok P 2 = 1,5 ml x 5 = 7,50 ml

Kelompok P 3 = 3 ml x 5 = 15 ml

Total/hari = 26,25 ml → 30 ml

*nb : jumlah tikus per kelompok perlakuan

$$\begin{aligned} \text{Dalam 14 hari} &= 14 \text{ hari} \times 30 \text{ ml} = 420 \rightarrow 500 \text{ ml} \\ &= 75 \text{ mg}/3 \text{ ml} = X \text{ (mg)}/500 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$X \text{ (ekstrak maja)} = 12.500 \text{ mg}$$

$$\text{Dalam 7 hari} = 12.500 \text{ mg}/500 \text{ ml} = X \text{ (mg)}/250 \text{ ml}$$

$$X \text{ (ekstrak maja)} = 6.250 \text{ mg}$$

b. Pembuatan CMC-Na 2%

$$2 \text{ g}/100 \text{ ml} = X \text{ (g)}/500 \text{ ml}$$

$$X \text{ (jumlah CMC-Na)} = 10 \text{ gram}/14 \text{ hari} \rightarrow 5 \text{ gram}/7 \text{ hari}$$

Penentuan dosis didasarkan pada beberapa penelitian, untuk ekstrak *Aegle marmelos* mempunyai dosis efektif pada tikus antara 200 mg/kgBB - 300 mg/kgBB (Shankarananth *et al.*, 2007) dan dosis efektif pada manusia antara 200 mg/kgBB/hari – 400 mg/kgBB/hari (Sharma *et al.*, 2011).

Pemberian ekstrak *Aegle marmelos* dilakukan per oral menggunakan sonde lambung setiap hari selama 14 hari dengan dosis 0,75 ml/tikus/hari untuk kelompok III, dosis 1,5 ml/tikus/hari untuk kelompok IV dan dosis 3 ml/tikus/hari untuk kelompok V.

5. Preparasi Organ dan Pengecatan/Staining

Pada akhir pemaparan semua kelompok diterminasi dengan cara pembiusan total menggunakan inhalasi kloroform dan diambil jaringan trakhea utama didekat percabangan (*bifurcatio*) sepanjang 1,5 cm, kemudian direndam dalam larutan formalin buffer 10 %, setelah itu dibuat blok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut untuk dibuat slide. Setelah itu dilakukan pewarnaan dengan *Hematoksilin Eosin*

(HE) untuk melihat dan menghitung jumlah eosinofil trakhea, untuk selanjutnya diidentifikasi dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x (Hermawan, 2009).

Cat yang umum dipakai dalam hispatologi adalah Hematoxylin-Eosin (HE). Pengecatan menggunakan HE diawali dengan melakukan deparafinisasi dengan memasukkan preparat ke xylol I, II, III masing-masing selama 3 menit. Deparafinisasi berfungsi untuk melarutkan/melepaskan paraffin yang ada pada preparat. Setelah itu dilap dengan kain kassa di sekitar jaringan. Lalu dilanjutkan dengan melakukan rehidrasi yaitu preparat masuk ke alkohol 100%, 95%, 80%, dan 70% masing – masing selama 2 menit. Rehidrasi berfungsi untuk melarutkan/melepaskan xylol yang terbawa oleh preparat dan memasukkan kadar air ke dalam jaringan dengan cara bertahap mulai alkohol 100% sampai 70%. Preparat dicuci pada air mengalir selama 3 menit untuk melepaskan sisa cat/cairan yang terbawa sebelumnya

Pengecatan inti dilakukan dengan cara memasukkan preparat ke dalam larutan Mayer Hematoksilin selama 7 menit. Pengecatan ini dilakukan untuk memberikan warna biru pada inti sel. Preparat masuk ke air mengalir selama 7 menit. Kemudian dilakukan *Counter stain* dengan memasukkan preparat ke larutan eosin selama $\pm 0,5$ menit. Hal ini dilakukan untuk memberikan warna merah pada sitoplasma, jaringan ikat, dan lainnya. Cat ini juga disebut *Counter stain* atau penyeimbang. Preparat masuk ke air wadah I, II, III masing – masing 3 celup.

Langkah selanjutnya yaitu lakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke alkohol 70%, 80%, 95% dan 100% masing – masing 3 celup. Dehidrasi berfungsi melepaskan/mengeluarkan air yang terbawa oleh preparat mulai dari alkohol 70% sampai 100%. Setelah itu dilap dengan kain kasa di sekitar jaringan. Kemudian dilakukan *clearing* preparat dengan memasukkannya ke dalam xylol I dan II masing – masing selama 2 menit. *Clearing* berfungsi melarutkan/melepaskan sisa alkohol yang terbawa oleh preparat dan juga memberikan warna yang bening terhadap jaringan.

Langkah terakhir pengecatan HE yaitu lakukan *mounting* dengan meneteskan 1 tetes Entelan dan Dek Glass pada preparat. *Mounting* berfungsi memberikan warna yang cerah (tidak kusam) dan sebagai pelindung / pengawet jaringan dari mikroba/bakteri. *Mounting* bersifat permanen seperti Entelan, Canada balsam, Hipermount, EZ-mount dan lainnya.

6. Analisis KLT dan Densitometri

a. Fraksinasi Ekstrak

1) Fraksi Heksana

Ekstrak kental 30 mg diencerkan terlebih dahulu ke dalam cawan porselen dengan sedikit etanol 96%, kemudian ditambahkan dengan heksana secukupnya. Sisihkan sedikit untuk penotolan fraksi heksana 1 (fh1). Setelah itu diuapkan hingga mendapat kekentalan yang optimal. Kemudian tambahkan HCl 2N sebanyak 4 - 6 ml, lalu tambahkan heksana beberapa ml dan lakukan penggojokan didalam tabung reaksi. Kemudian pisahkan antara larutan asam (berwarna

putih bening) dan larutan heksana (berwarna hijau muda). Larutan heksana ini digunakan untuk penotolan fraksi heksana 2 (fh₂).

2) Fraksi kloroform

Larutan asam pada proses fraksinasi heksana diletakkan ke dalam cawan porselen kemudian ditambahkan NH₄OH, diaduk lalu ditambahkan kloroform (CHCl₃) dan lakukan pengadukan kembali. Setelah itu masukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian lakukan penggojokan. Larutan di dalam tabung reaksi akan terpisah menjadi larutan ampas (berwarna kuning) dan larutan kloroform (berwarna putih bening). Larutan kloroform ini digunakan untuk penotolan fraksi kloroform (fk).

b. Kromatografi Lapis Tipis

1) Deteksi Kumarin

Ekstrak kental yang telah dilarutkan dengan etanol 96% dan diolah menjadi fraksi heksana dan fraksi kloroform diletakkan ke dalam cawan porselen yang berbeda. Masing-masing diuapkan hingga mendapatkan kekentalan yang optimal. Sebelumnya disiapkan peralatan untuk kromatografi lapis tipis (KLT) yaitu gelas kaca (gelas minum), fase diam plat silika gel dan fase gerak menggunakan campuran n-heksana dengan etil asetat (4:1), sebelum digunakan fase diam diukur titik penotolannya dan fase gerak dijenuhkan didalam gelas kaca kira-kira 10 menit sebelum dilakukan proses KLT.

Setelah diuapkan, fraksi heksana 1 (fh1) ditotolkan pada plat KLT (penotolan 1) menggunakan pipet kapiler sebanyak 3 totolan. Kemudian lakukan penotolan fraksi kloroform (fk) (penotolan 2) dan ekstrak yang dilarutkan dengan etanol (penotolan 3) masing-masing sebanyak 3 totolan pipet kapiler pada plat KLT. Setelah didiamkan beberapa saat, plat KLT dimasukkan ke dalam gelas kaca yang telah diberi n-heksana dan etil asetat, kemudian ditutup rapat ditunggu sampai elusi selesai. Plat KLT yang telah melalui proses elusidasi diangkat dari gelas kaca lalu didiamkan beberapa saat, kemudian dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil deteksi dapat dipastikan dengan melakukan penyemprotan plat KLT menggunakan vanillin sulfat

2) Deteksi Steroid

Uji steroid ini menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan membuat 4 titik penotolan, diantaranya fraksi heksana 1 (penotolan 1), fraksi heksana 2 (penotolan 2) dan fraksi kloroform (penotolan 3 dan 4). Proses KLT ini menggunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4 dan 2.

Fase gerak yang telah dijenuhkan kurang lebih 10 menit di dalam gelas kaca, plat KLT dimasukkan dan ditunggu hingga batas elusi selesai. Setelah proses elusidasi selesai plat KLT diangkat dan didiamkan beberapa saat kemudian dilakukan deteksi bercak dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dilakukan pendeteksian

bercak secara kimia yaitu dengan penyemprotan reagen Lieberman Burchard yang telah dipersiapkan sebelumnya.

Untuk mendeteksi senyawa seperti lupeol dan lupenol, maka peneliti melakukan uji steroid dengan penyemprotan reagen Lieberman Burchard. Reagen Lieberman Burchard dibuat dengan mencampurkan 0,5 ml anhidrida asetat dan 0,5 ml asam sulfat (H_2SO_4) pekat yang diencerkan dengan 4 ml etanol 96%.

3) Deteksi Alkaloid

Reaksi identifikasi senyawa alkaloid seperti aegelin yang merupakan salah satu senyawa yang potensial berefek sebagai antialergi ini menggunakan metode yang tercantum dalam *Materia Medika Indonesia Edisi V*. Identifikasi dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan fase gerak toluene : eter : dietil eter (55:33:10) dan deteksi bercak dengan menyemprot pereaksi Dragendorff.

Ekstrak kental yang telah diencerkan menggunakan etanol dan difraksi menggunakan heksana diuapkan lalu ditambahkan dengan HCl 2N. penambahan HCl 2N dimaksudkan untuk menarik senyawa alkaloid dalam ekstrak karena alkaloid bersifat basa maka dengan penambahan asam seperti HCl akan terbentuk garam ataupun alkaloid dalam bentuk basa bebas, sehingga alkaloid akan terpisah dengan komponen-komponen lain dari senyawa yang ikut terekstrak dengan mendistribusikannya ke fase asam (Wullur et al., 2013).

Larutan asam (berwarna bening) kemudian dipisahkan dari fraksi heksana setelah sebelumnya dilakukan penggojokan. Kemudian larutan asam ini ditambahkan NH_4OH untuk menetralkan sifat asam larutan. Penarikan senyawa alkaloid kembali dilakukan dengan menambahkan kloroform karena alkaloid mempunyai kelarutan yang baik dalam kloroform. Setelah itu lakukan penggojokan dan pisahkan fraksi kloroform (berwarna bening) dari ampasnya.

Frakasi kloroform ini kemudian ditotolkan pada plat KLT, lalu dimasukkan ke dalam gelas kaca berisi eluen toluene : eter : dietil eter yang sebelumnya telah dijenuhkan. Tujuan dipilihnya tiga pelarut tersebut karena masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda dapat terpisahkan dengan eluen tersebut (Wullur *et al.*, 2013). Setelah proses elusidasi selesai, amati noda menggunakan sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Selanjutnya lempeng disemprot dengan pereaksi Dragendorff untuk menampakkan noda atau bercaknya pada sinar tampak.

c. Pemindaian λ_{maks}

Alat densitometer (Camag®) dihubungkan ke PC. Lempengan KLT yang akan di analisa diletakkan pada densitometer. Sebelum menganalisis lempeng KLT dimulai dengan menentukan letak sumbu x dan letak sumbu y, catat angka yang terlihat. Kemudian ditentukan angka awal analisis / bercak dan akhir analisis / bercak, catat kedua angka yang

terlihat. Semua angka tersebut kemudian dimasukkan ke dalam program. Dilanjutkan dengan menentukan panjang gelombang analisis yang akan di gunakan serta sesuaikan dengan sumber cahayanya.

Jika seluruh data sudah masuk ke program, barulah dilakukan analisis / *scanning* pada lempeng KLT, Untuk memperoleh data KLT-densitometri yang baik dilakukan integrasi secara manual. Kemudian percobaan diulangi dengan cara merubah letak analisis pada masing-masing noda / bercak

H. ANALISIS DATA DAN STATISTIKA

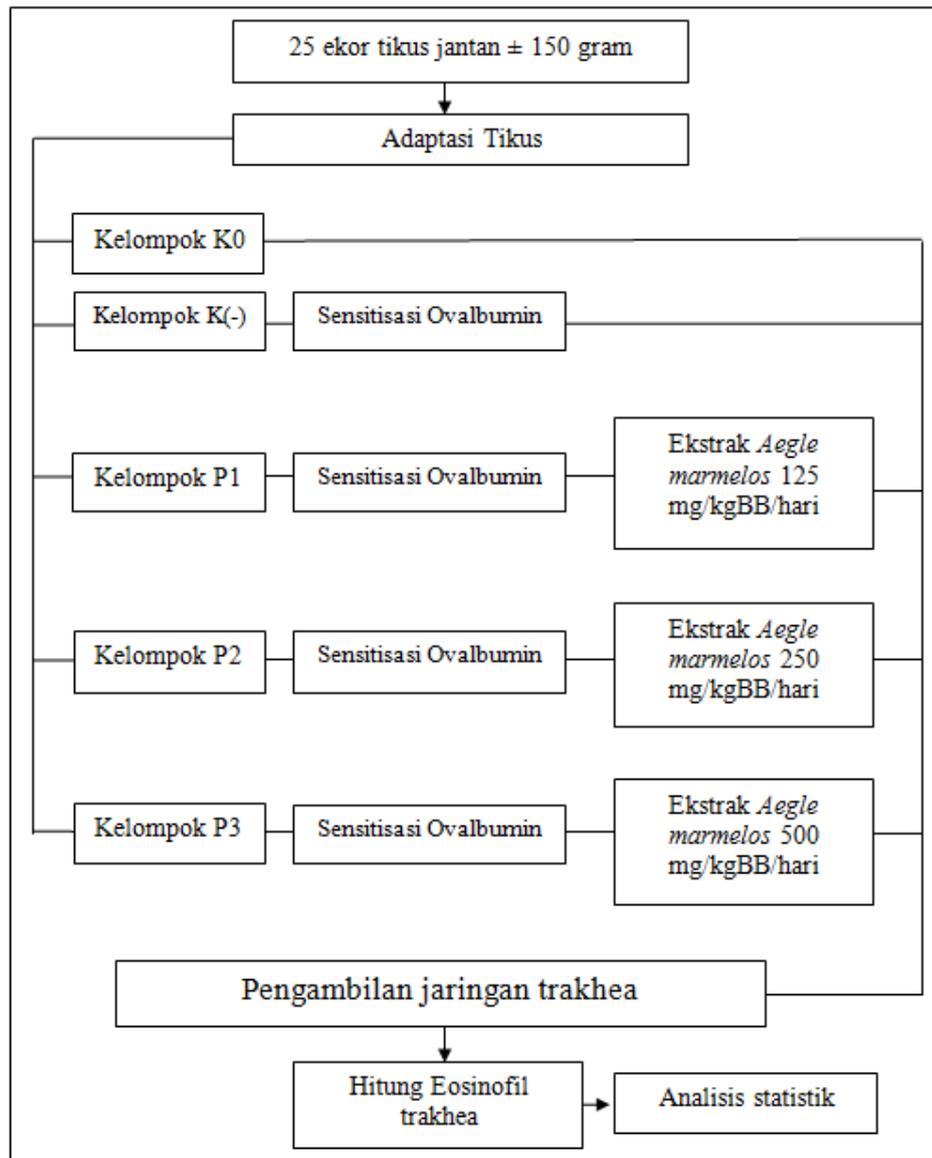
Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Pertama-tama akan dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Bila distribusi datanya normal ($P > 0.05$), maka digunakan uji *one-Way ANOVA* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan uji *Post Hoc Test*.

Sedangkan bila distribusi datanya tidak normal ($P < 0.05$), maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* dan untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok perlakuan digunakan *Mann-Whitney U*.

Semua analisis statistic tersebut dilakukan dengan menggunakan program computer *SPSS for Windows*.

I. ALUR PENELITIAN

Secara umum, alur penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 11. Skema alur penelitian